



ISSN 1518-4277

Dezembro, 2005

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 43

Transformação Genética de Sorgo Utilizando o Bombardeamento de Partículas

Rosângela Luci Brandão
Andréa Almeida Carneiro
Newton Portilho Carneiro
Robert Eugene Schaffert
Luciano Paiva
Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho

Sete Lagoas, MG
2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3779 1000
Fax: (31) 3779 1088
Home page: www.cnpms.embrapa.br
E-mail: sac@cnpms.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Antônio Carlos de Oliveira
Secretário-Executivo: Paulo César Magalhães
Membros: Camilo de Lélis Teixeira de Andrade, Cláudia Teixeira
Guimarães, Carlos Roberto Casela, José Carlos Cruz e Márcio
Antônio Rezende Monteiro

Supervisor editorial: Clenio Araujo
Revisor de texto: Dilermando Lúcio de Oliveira
Normalização bibliográfica: Maria Tereza Rocha Ferreira
Editoração eletrônica: Dilermando Lúcio de Oliveira

1ª edição

1ª impressão (2005): 200 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Brandão, Rosângela Luci

Transformação genética de sorgo utilizando o
bombardeamento de partículas / Rosângela Luci Brandão...[et
al.]. – Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2005.
. 38 p. ; 21 cm. - (Documentos / Embrapa Milho
e Sorgo, ISSN 1518-4277 ; 43).

1. Sorgo. 2. Bombardeamento. 3. Transformação I.
Brandão, Rosângela Luci. II. Série

CDD 633. 17

© Embrapa 2005

Autores

Rosângela Luci Brandão

Estudante de doutorado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras – UFLA - Campus Universitário - Caixa Postal 3037 - CEP 37200-000 - Lavras MG. rosangela-brandao@bol.com.br

Andréa Almeida Carneiro*

Ph.D. Biologia Molecular e Cultura de Tecidos – Embrapa Milho e Sorgo - Rodovia MG 424, Km 45 - Caixa Postal 151 – CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG. andreac@cnpmis.embrapa.br

Newton Portilho Carneiro

Ph.D Biologia Molecular – Embrapa Milho e Sorgo.
newtonc@cnpmis.embrapa.br

Robert Eugene Schaffert

Ph.D. Genética Melhoramento de Plantas – Embrapa Milho e Sorgo.
schaffer@cnpmis.embrapa.br

Luciano Paiva

D.S. Biologia Molecular – Universidade Federal de Lavras. luciano@ufla.br

Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho

Estudante de doutorado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Lavras. gracielle.costa@gmail.com.

*Autora para correspondência.

Sumário

Introdução	7
Bombardeamento de Partículas ou Biobalística	9
Transformação por Biobalística	9
Fatores Importantes na Transformação Genética Via	
Biobalística	12
Construção Gênica	12
Parâmetros Físicos Relacionados ao Aparelho a Ser Utilizado	17
Parâmetros Relacionados aos Microprojéteis	18
Parâmetros Biológicos	18
Transformação Genética de Sorgo Via Biobalística	19
Cultura de Tecido de Sorgo - Produção de calos	
embriogênicos da linhagem de sorgo CMSXS 112B w e	
regeneração de plantas	20
Transformação de Calos Embriogênicos de Sorgo Utilizando a	
Biobalística	24
Precipitação do DNA sob as Micropartículas	26
Seleção de Plantas Transgênicas de Sorgo	
Após o Bombardeamento	28
Identificação de Plantas Transgênicas	30

Isolamento de DNA Genômico	32
Soluções.....	33
Pré-Hibridação	34
Hibridação	34
Solução para a Transferência do DNA para a Membrana	36
Referências Bibliográficas	37

Transformação Genética de Sorgo Utilizando o Bombardeamento de Partículas

Rosângela Luci Brandão

Andréa Almeida Carneiro

Newton Portilho Carneiro

Robert Eugene Schaffert

Luciano Paiva

Gracielle Teodora da Costa Pinto Coelho

Introdução

As técnicas de biotecnologia, aliadas ao melhoramento convencional, podem contribuir significativamente para um aumento do desenvolvimento vegetativo e da biomassa das plantas. A introdução de genes, via transformação genética, representa um importante instrumento para atingir esses objetivos. Através da transformação genética, pode-se incorporar genes desejáveis, com características de interesse econômico, levando ao desenvolvimento de cultivares cada vez mais produtivas, adaptadas às mais diversas condições de cultivo e resistentes a diferentes pragas e doenças, com mínima alteração no genoma.

A partir do final da década de 70, vem sendo realizada, com sucesso, transformação genética de plantas dicotiledôneas com genes de outras espécies não intercruzáveis. Muitas dessas espécies são hospedeiras naturais de *Agrobacterium tumefaciens*, um patógeno que se tornou extremamente útil em engenharia genética de plantas, devido a sua capacidade de infectar e transferir material genético para o genoma vegetal (revisado por Zupan e Zambryski, 1997). Outras técnicas de

transformação utilizando DNA livre, tais como microinjeção, eletroporação e biobalística (revisado por Potrykus, 1990), foram desenvolvidas para outras espécies, que, até recentemente, eram consideradas não-suscetíveis à infecção por *A. tumefaciens*, tais como as gramíneas.

Com o crescimento dos setores da avicultura, da suinocultura e da bovinocultura, a demanda de grãos, no Brasil, cresce sistematicamente (Coelho *et al.*, 2002). Apesar do aumento nas safras brasileiras de milho, ainda há dificuldades para o atendimento a essa demanda em expansão. Sorgo, o sexto cereal mais cultivado do mundo, é uma cultura economicamente importante. Devido ao seu valor agrônomo e nutritivo, é uma planta que pode ser comparada ao milho (Rodrigues *et al.*, 2002). Assim sendo, o sorgo aparece como uma alternativa interessante, uma vez que seu cultivo pode atender com maior economia uma parte da demanda brasileira de grãos (Coelho *et al.*, 2002). Entretanto, verifica-se que sua produtividade é baixa (1.500 a 2.500 kg/ha) e extremamente variável ao longo dos anos, típica de uma cultura semeada em condições marginais de clima e, principalmente, sem uso de tecnologias. Os principais fatores que afetam os sistemas de produção da cultura de sorgo são os de aspectos econômico, ambiental, tecnológico e qualidade do produto (Coelho *et al.*, 2002). Deste modo, fica claro que o desenvolvimento de cultivares superiores mais produtivas, através da introdução de genes de resistência a vários estresses bióticos e abióticos é altamente desejável.

Nesta publicação, é descrito o método de produção de plantas transgênicas de sorgo, via biobalística, desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo. São abordadas todas as etapas do processo, que vão desde a preparação dos explantes utilizados para o bombardeamento de partículas até a identificação das plantas transgênicas.

Bombardeamento de Partículas ou Biobalística

Transformação por Biobalística

A técnica de biobalística consiste na inserção de micropartículas de ouro ou tungstênio, revestidas com DNA de interesse, no núcleo de plantas. Uma vez dentro da célula, a construção gênica pode-se integrar no genoma da planta. As micropartículas podem ser aceleradas por gás comprimido (hélio), com velocidade suficiente (1.500 km/h) para penetrarem as células de um tecido alvo. Esse processo ocorre no interior de uma câmara sob vácuo, para evitar que o ar provoque a desaceleração das micropartículas. O aparelho responsável por gerar a onda de choque é denominado acelerador de micropartículas, também conhecido como “gene gun” (Figuras 1 e 2). Esse aparelho contém um reservatório (Figuras 1 A e B) onde a pressão do gás hélio é mantida através de “membrana de ruptura” (Figura 1C), que são membranas fabricadas para se romperem a pressões pré-determinadas. O canhão gênico utiliza uma membrana macrocarreadora, de grande resistência e baixo peso, a qual suporta ou carrega as micropartículas cobertas com DNA (Figura 1 D). A liberação do hélio produz uma onda de choque em direção à membrana macrocarreadora (Figuras 1 E, F e G). O complexo membrana macrocarreadora e as micropartículas (Figura 1 H) é acelerado em direção ao tecido alvo (Figura 1 I). A membrana macrocarreadora é retida por uma tela, para evitar que essa colida com o alvo; entretanto, as micropartículas continuam aceleradas em direção aos explantes vegetais (Figura 2).

A técnica é bastante versátil, pois, além da transformação nuclear, também pode ser utilizada para transformar organelas como a mitocôndria ou o cloroplasto. Essa técnica é relativamente simples, rápida e não envolve muito investimento de infra-estrutura e equipamentos. O processo da biobalística tem-se mostrado efetivo desde a transformação de microrganismos até plantas e animais (Sanford *et al.*, 1993). Uma das

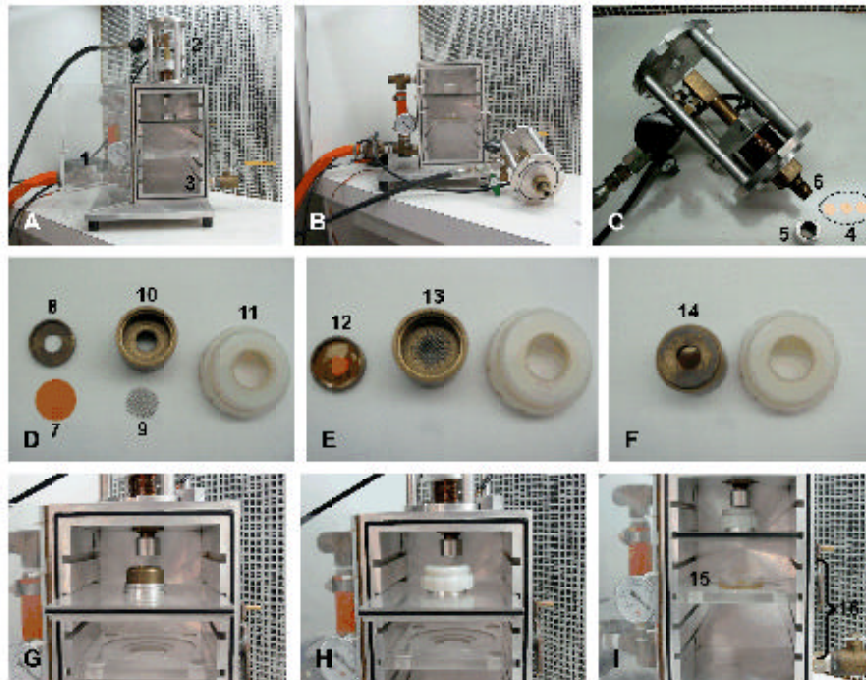


Figura 1. Gene gun utilizado para a transferência direta de genes. **A:** Vista geral do aparelho de bombardeamento de partículas - (1) Controles do vácuo, (2) Câmara para contenção de gás hélio e controles para sua liberação, (3) Câmara de vácuo; **B:** Vista geral da câmara de contenção do gás hélio e da câmara de vácuo; **C:** Detalhamento da câmara de contenção do gás hélio - (4) Membranas de ruptura, (5) Suporte das membranas de ruptura, (6) Encaixe do suporte das membranas de ruptura dentro da câmara de gás hélio; **D:** Detalhe do suporte das micropartículas - (7) Membrana macrocarreadora, (8) Suporte para a membrana macrocarreadora, (9) Tela de retenção da membrana macrocarreadora, (10) Suporte da tela de retenção, (11) Dispositivo que mantém todo o conjunto unido dentro da câmara de vácuo; **E, F, G e H:** Montagem das peças mostradas em D, dentro da câmara de vácuo; **I:** Colocação dos explantes dentro da câmara de vácuo para o bombardeamento de partículas - (15) Explantes dentro de uma placa de Petri, (16) Diferentes distâncias que os explantes podem ser posicionados relativos à posição das micropartículas cobertas com DNA.

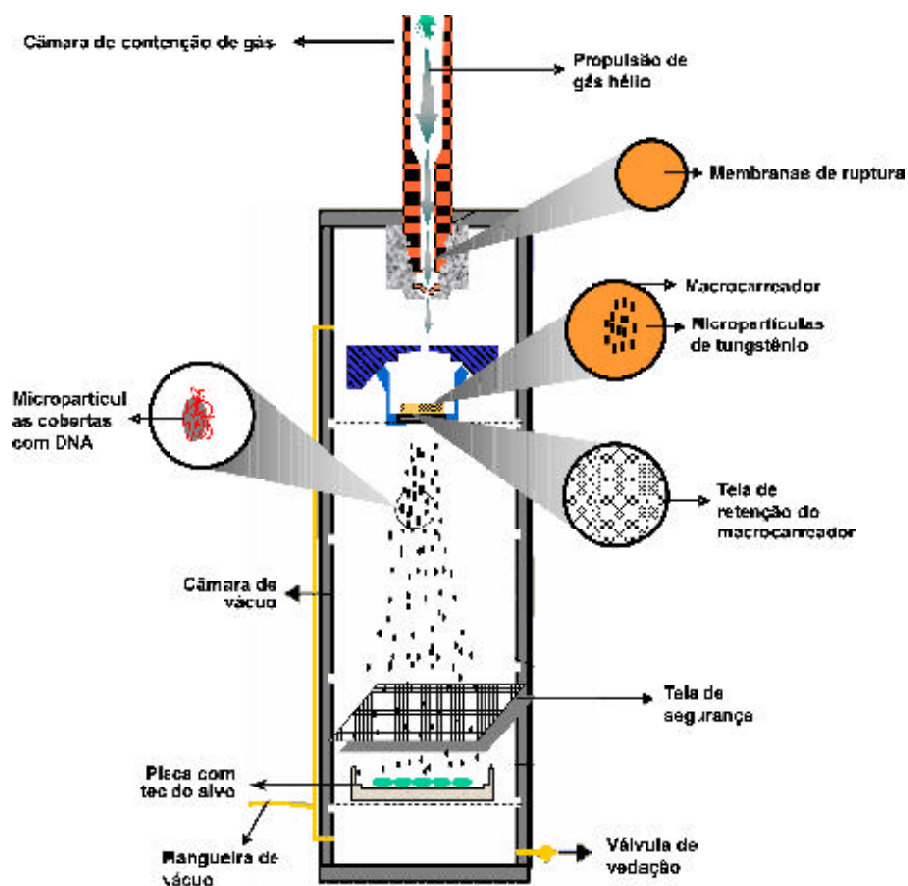


Figura 2. Esquema do processo de transferência direta de genes através da biobalística.

principais vantagens é a eficiência na transformação de Gymnospermas e Angiospermas monocotiledôneas, o que não é observado na transformação por meio de *Agrobacterium* (Brasileiro e Cançado, 2000). O bombardeamento de construções gênicas usando biobalística tem sido amplamente usado em cereais (Becker *et al.*, 1994). Outra vantagem em se usar a técnica da biobalística é que vários tecidos podem ser bombardeados como, por exemplo, inflorescências, micrósporos ou embriões imaturos, e não existe o problema da necessidade de se usar uma

Agrobacterium específica para a linhagem com que se está trabalhando (Becker *et al.*, 1994; Barcelo *et al.*, 1994). Uma das desvantagens em se usar biobalística é que normalmente várias cópias da construção gênica são transferidas para a planta, mas esse problema pode ser manipulado usando técnicas de genética básica. A biobalística tem-se mostrado um método bastante eficiente para a introdução de novas características em cereais. Vários protocolos de regeneração e transformação de cereais usando a técnica da biobalística estão sendo publicados (Casas *et al.*, 1993; Brettschneider *et al.*, 1997; Devi and Sticklen, 2002; Tadesse *et al.*, 2003).

Fatores Importantes Na Transformação Genética Via Biobalística

Parâmetros físicos relacionados ao acelerador de micropartículas e aos microprojéteis, requerimentos biológicos da cultura de tecidos do sorgo, bem como a construção gênica contendo o gene de interesse são fatores importantes e devem ser estudados durante a otimização de um protocolo de transformação genética.

Construção Gênica

O material genético que será utilizado no bombardeamento necessita ser clonado em um vetor, amplificado e purificado de maneira cuidadosa, para render DNA concentrado de alta qualidade. Geralmente, são utilizados plasmídeos bacterianos como vetores na clonagem do gene de interesse. Os plasmídeos bacterianos são independentes do DNA cromossômico (Figura 3), capazes de autorreplicação; por isso, são facilmente manipulados no processo de transformação genética.

Na construção gênica, é necessário ter um gene “de interesse” que pode estar relacionado com a resistência ou maior tolerância a algum tipo de estresse biótico ou abiótico, com a melhoria da qualidade nutricional, etc.,

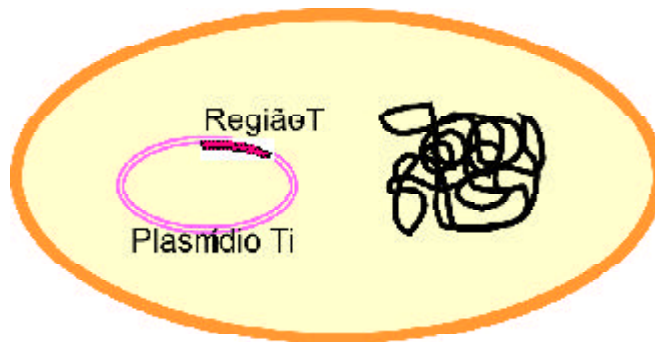


Figura 3. *Agrobacterium tumefaciens* e seu plasmídeo Ti.

acoplado a um promotor que controle sua expressão temporal e espacial. Há também a necessidade de um gene marcador de seleção, quando a característica de interesse não é auto-selecionável, e um gene-repórter durante o período de otimização do protocolo de transformação genética (Figura 4).

Os genes marcadores são utilizados na seleção e são responsáveis por codificar uma proteína com atividade enzimática ou um produto que irá conferir às células transformadas da planta resistência a um determinado substrato (herbicida, antibióticos, etc.) (Tabela 2). Esses genes marcadores permitem que apenas as células transformadas cresçam, em detrimento das células não-transformadas. Depois da transformação, as células transgênicas estão em número muito reduzido, quando comparadas com as não-transgênicas, sendo necessária uma metodologia de seleção para proporcionar o crescimento preferencial das células transformadas.

Os genes-repórteres são aqueles que codificam para uma proteína não tóxica, cujo produto é facilmente detectável e não é produzido normalmente pelas plantas (Figura 5 -Tabela 1). Possibilitam a identificação ou marcação das células transformadas, sem eliminar as células não-transformadas. Funcionam como gene complementar ao gene de seleção. Geralmente, sua expressão transiente é utilizada na fase de otimização dos

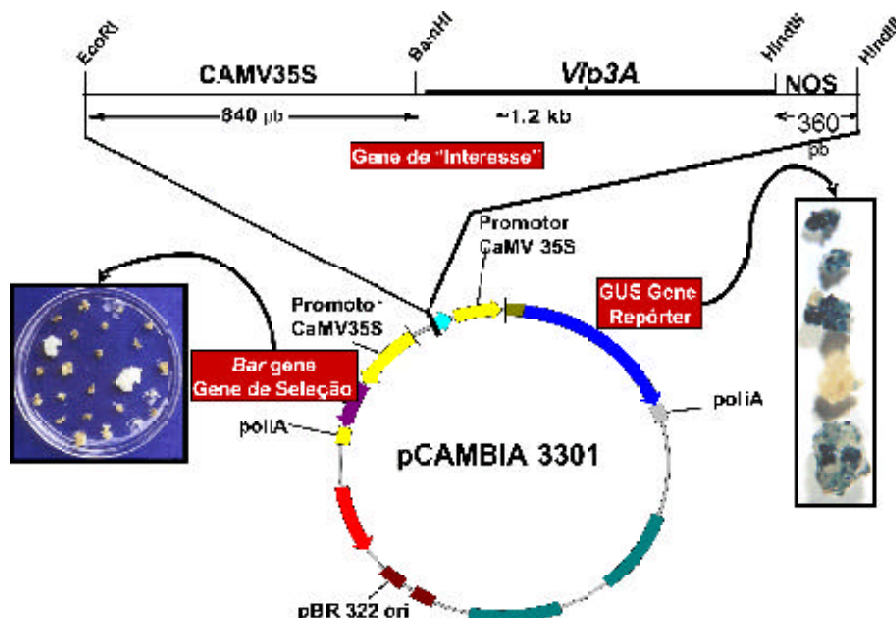


Figura 4. Vetor pCAMBIA 3301. Exemplo de DNA plasmidial utilizado para transformação vegetal por biobalística. O Gene de “Interesse” é representado aqui pelo *Vip3A*, capaz de controlar a *Spodoptera frugiperda* em plantas transgênicas. Note a presença do promotor CaMV35S direcionando a síntese do gene e o terminador NOS. O gene de seleção utilizado foi a fosfinotricina acetiltransferase (*bar*), o qual confere resistência ao herbicida fosfinotricina (ingrediente ativo do herbicida FINALE - Agrevo). O gene repórter presente neste cassete gênico é o GUS (b-glucuronidase), este gene é utilizado na otimização dos protocolos de transformação genética de plantas; na foto podem ser vistos calos com coloração azul, expressando o gene repórter GUS. (A) calos bombardeados e subcultivados em meio de cultura contendo o herbicida FINALE. Observe a presença de dois calos se desenvolvendo, enquanto que os demais estão mortos. (B) calos bombardeados expressando a enzima b-glucuronidase, a qual confere coloração azul ao tecido transgênico. *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*: enzimas de restrição.

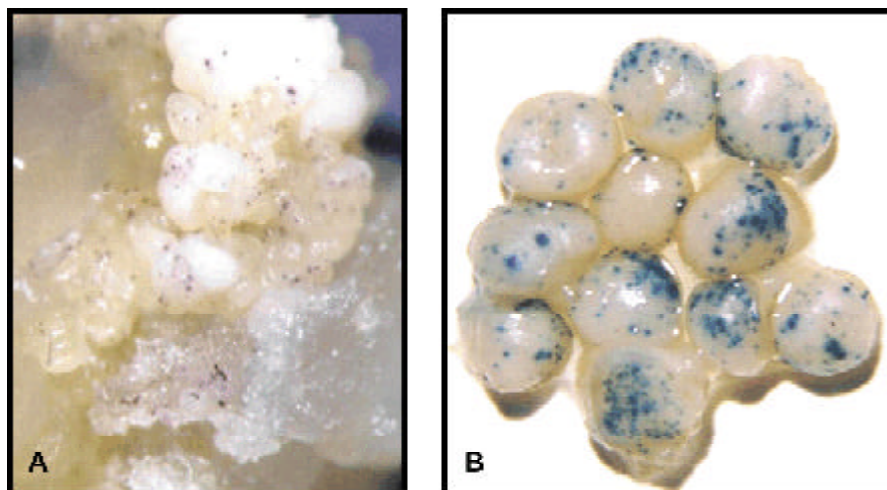


Figura 5. Expressão Transiente de Genes Repórteres. (A) Calo embriogênico de sorgo expressando o gene repórter da antocianina (coloração vermelhas) sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina; (B) Embrião imaturo de milho expressando o gene repórter GUS (coloração azul) sob o controle do promotor constitutivo da Ubiquitina.

Tabela 1. Genes repórteres utilizados em transformação genética de plantas.

Genes Repórteres	Proteína	Comentários
CAT	chloramphenicol acetil transferase	<ul style="list-style-type: none"> um dos primeiros gene repórter análise difícil e envolve radioatividade
GUS	β -glucuronidase	<ul style="list-style-type: none"> avaliação rápida e fácil por métodos histoquímicos e fluorométricos
LUC	luciferase	<ul style="list-style-type: none"> um dos métodos mais sensíveis para medir a atividade de um gene uso limitado por causa do preço do equipamento utilizado para medir quantitativamente
R gene	antocianina	<ul style="list-style-type: none"> não requer substratos externos
GFP	Proteína verde fluorescente	<ul style="list-style-type: none"> permite a avaliação <i>in vivo</i> do transgene

Tabela 2. Genes de seleção utilizados na transformação genética de plantas.

Genes de Resistência	Proteína / Origem	Local de ação	Agente de seleção	Mecanismo de resistência
<i>aphA</i>	Neomicina fosfotransferase/ Transposon Tn5 de <i>E. coli</i>	Síntese protéica	Canamicina Neomicina Gentamicina	Fosforilação do agente seletivo
<i>hpt</i>	Higromicina fosfotransferase/ <i>E. coli</i>	Síntese protéica	Higromicina	Fosforilação do agente seletivo
<i>surB</i> Hra e <i>ssr1-1</i>	Forma mutante da acetolactato sintase (ALS) ou ácido acetilhidroxil sintase (AHAS)/ Genes foram isolados de: <i>surB</i> -Hra - tabaco <i>ssr1-1</i> - <i>Arabidopsis</i>	Síntese de aminoácidos	Herbicidas sulfonilureas como por exemplo o chlorsulfuron	Modificação da enzima alvo
<i>aroA</i>	Forma mutante da enzima 5 enolpiruvil-3- fosfochiquimato sintase (EPSP)/ <i>Salmonella typhimurium</i>	Síntese de aminoácidos	Herbicida glyphosate, Roundup	Modificação ou amplificação da enzima alvo
<i>bar</i>	Fosfinotricina acetil transferase (PAT)/ <i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Síntese de aminoácidos	Herbicida fosfinotricin (PPT), Basta	Acetilação do agente seletivo
<i>psb A</i>	Q ₂ / Atrazina resistente <i>Amaranthus hybridus</i>	fotossíntese	Herbicida atrazina	Modificação da enzima alvo
<i>bxn</i>	Nitrilase / <i>Klebsiella pneumoniae</i>	fotossíntese	Herbicida bromoxynil	Degradação do agente seletivo
<i>dhfr</i>	Dihidrofolato redutase (DHFR)/ rato	Biossíntese de nucleotídeos	Methotrexato	Modificação da enzima alvo
<i>manA</i>	phosphomannose isomerase/ <i>Escherichia coli</i>	Biossíntese de carboidratos	Mannose	Transformação da mannose, carboidrato não utilizável pela planta, em frutose, carboidrato utilizável.

processos de transformação genética. São também muito utilizados em estudos de regulação e função gênica.

Parâmetros Físicos Relacionados ao Aparelho a Ser Utilizado

Variações da pressão do gás hélio, o nível do vácuo gerado, o tamanho e o tipo das partículas utilizadas e a posição do tecido-alvo dentro da câmara de bombardeamento são parâmetros físicos importantes no transporte do conjunto micropartícula/DNA para dentro do tecido-alvo. Esses processos devem favorecer a penetração do DNA dentro das células e, ao mesmo tempo, minimizar as injúrias ou estresses que o tecido vegetal possa sofrer. Os parâmetros físicos estudados durante a otimização de um protocolo de bombardeamento de partículas são:

1. Pressão do gás hélio, distância percorrida pelo macrocarreador e distância percorrida pelos microprojéteis até o alvo biológico são fatores que afetam a velocidade de propulsão das micropartículas cobertas com DNA. Como esses fatores interagem entre si, experimentos devem ser conduzidos para testar as melhores combinações entre eles, para que ótimos índices de transformação sejam alcançados.
2. Vácuo – Como o ar residual presente na câmara de bombardeamento desacelera os microprojéteis rapidamente, a sua quantidade na câmara de bombardeamento precisa ser reduzida. O nível de vácuo deve ser otimizado para cada sistema, de modo que não ocorram danos às células que serão bombardeadas.
3. Membranas de metal – Essas membranas, quando colocadas sobre as placas contendo o material vegetal a ser bombardeado, ajudam a minimizar o choque causado pela movimentação do gás hélio, dentro da câmara de bombardeamento, durante a aceleração das partículas.

Parâmetros Relacionados aos Microprojéteis

O tipo e o tamanho da micropartícula são características importantes, uma vez que determinarão a sua profundidade de penetração e aceleração. As micropartículas mais utilizadas em bombardeamento são de tungstênio ou de ouro. Ambas possuem vantagens e desvantagens de utilização.

As micropartículas de tungstênio podem ser obtidas de vários tamanhos (0,5 a 2,0 μm) e são extremamente irregulares. O tungstênio é um material barato e mais fácil de ser coberto com DNA. Entretanto, pode ser tóxico para algumas células e sua superfície é sujeita a reações de oxidação, o que pode degradar o DNA, com o tempo.

As partículas de ouro são mais redondas e uniformes do que as de tungstênio. Uma grande vantagem dessas partículas é que elas são biologicamente inertes, não são tóxicas para nenhuma célula, não destruindo o DNA, com o tempo. O alto preço das micropartículas de ouro e a maior dificuldade de precipitação do DNA sobre elas são suas desvantagens.

Parâmetros Biológicos

1. Tecido vegetal - A escolha do tecido vegetal que será utilizado para a geração de plantas transgênicas pode ter um efeito significativo na frequência e no sucesso dos eventos de transformação e, especialmente, no número de plantas recuperadas. Explantes utilizados para o bombardeamento de partículas e recuperação de plantas transgênicas devem ser capazes de receber e integrar o DNA, passar por um processo de seleção para recuperação de células transgênicas e regenerar plantas férteis e fenotipicamente normais. Por causa da baixa frequência de células transformadas após o bombardeamento de partículas ($\sim 0,01\%$), a eficiência do processo de regeneração do tecido-alvo precisa ser alta para a obtenção de plantas transgênicas. Uma grande variedade de tecidos de

vegetais tem sido utilizada como alvo para o bombardeamento de partículas. Tecidos embriogênicos e meristemáticos são os mais empregados na produção e recuperação de plantas transgênicas. Tais culturas consistem de tecidos que estão rapidamente proliferando onde uma grande quantidade de células totipotentes estão disponíveis para serem bombardeadas. As condições exatas requeridas na cultura de tecidos para gerar tecidos embriogênicos e meristemáticos de alta qualidade, variam entre espécies e até mesmo entre genótipos dentro de uma mesma espécie e precisam ser empiricamente determinadas. Enquanto algumas cultivares dentro de uma espécie respondem muito bem às técnicas de cultura de tecidos e produzem tecidos de alta qualidade para a integração do transgene, a maioria permanece difícil de manipular. A escolha do tecido-alvo apropriado e o estado fisiológico do material vegetal, antes e após o bombardeamento, são críticos para a regeneração de transformantes estáveis. Portanto, o desenvolvimento de protocolos para a obtenção de tecidos totipotentes, através de cultura de tecidos, é um dos componentes centrais dos programas de transformação genética de plantas.

2. Concentração osmótica – A adição de um agente que aumente a osmolaridade do meio de cultivo durante o bombardeamento pode aumentar as taxas de transformação. O aumento da concentração osmótica atua causando plasmólise das células, o que diminui a perda de protoplasma em células que são penetradas pelas partículas. Tem-se utilizado manitol, sorbitol, rafinose e sacarose ($\sim 0,4$ M) para o aumento da concentração osmótica do meio. Alguns autores utilizam a secagem parcial dos tecidos vegetais em capela de fluxo laminar antes do bombardeamento.

Transformação Genética de Sorgo via Biobalística

A seguir, será descrito o protocolo de transformação genética, via biobalística, de sorgo da linhagem CMSXS 112B, desenvolvido no

laboratório de Biologia Celular e Cultura de Tecidos da Embrapa Milho e Sorgo. Iniciamos com a produção de calos embriogênicos de sorgo, que serão utilizados como explantes para o bombardeamento de partículas, seguimos com a precipitação do DNA sobre as micropartículas de tungstênio, seleção das células transformadas, regeneração de plantas de sorgo, e finalizamos com a identificação das plantas transgênicas.

Cultura de Tecido de Sorgo – Produção de calos embriogênicos da linhagem de sorgo CMSXS 112B e regeneração de plantas

As condições da planta doadora de tecido vegetal (explantes) para a transformação genética são extremamente importantes. Plantas mais vigorosas produzem explantes com melhor resposta *in vitro*. Na Embrapa Milho e Sorgo, utilizam-se como explantes inflorescências jovens, as quais são coletadas entre 3,0 e 6,0 cm de comprimento, o que normalmente ocorre entre 30 e 40 dias após plantio, podendo chegar a 50 dias no período mais frio. No campo, quando as plantas atingirem aproximadamente 40 cm (Figura 6 A), é necessário fazer um desbaste, deixando uma distância de aproximadamente 10 cm entre as mesmas (Figura 6 B e C), para que cresçam mais vigorosas (Figura 6 D) e não tenham um amadurecimento precoce (Figura 7 B). É importante que a inflorescência utilizada para a formação de calos embriogênicos não tenha a arista visível a olho nu (Figura 7 C).

Para a desinfestação, dentro de uma câmara de fluxo laminar, inicialmente enxáguam-se as plantas com etanol 70% e água destilada autoclavada (Figuras 8 A e B). Em seguida, as folhas são retiradas com o auxílio de um bisturi, deixando somente a panícula (Figuras 8 C e D). As panículas são cortadas em seções de aproximadamente 5mm (Figura 8 E) e cultivadas em placas de Petri contendo o meio CIM + CB (Figura 8 F - Tabela 3).

Obs: É importante que todo o material utilizado durante o processo descrito acima esteja estéril e frio, para minimizar o estresse e a



Figura 6. Cultivo em canteiro da linhagem CMSXS 112B de sorgo para coleta de inflorescência imatura. (A) Tamanho médio da planta para desbaste; (B) Desbaste de algumas plantas; (C) Distância média entre as plantas para um melhor desenvolvimento das mesmas; (D) Plantas da linhagem CMSXS 112B desenvolvidas.

conseqüente liberação de compostos fenólicos, prejudiciais ao desenvolvimento da planta em cultura de tecido.

As placas são seladas com Parafilm ou filme de PVC, incubadas em câmara de crescimento, no escuro, a 26-28°C, por 20 a 30 dias. Após esse período, os calos podem ser utilizados para o bombardeamento de partículas (Figura 9 A e B).

Para a regeneração de plantas de sorgo, os calos embriogênicos são



Figura 7. Inflorescências imaturas da linhagem CMSXS 112B de sorgo. (A) Inflorescência imatura apropriada para formação de calos embriogênicos; (B) Inflorescência imatura com desenvolvimento precoce, ou seja, mais madura e com aristas mais visíveis do que as da figura A; (C) Aristas ampliadas. Barra: 2mm.

cultivados em meio RM (Tabela 3) e incubados a 25°C, no escuro. O objetivo do meio RM é forçar o amadurecimento dos embriões somáticos, através da redução da temperatura de cultivo (de 28 para 25°C) e do aumento do potencial osmótico do meio (60 g/l de sacarose e 0,3% de Gelrite). Após duas ou três semanas em meio RM, os embriões somáticos maduros, de coloração branca opaca (Figura 9 C), são transferidos para o meio MS (Tabela 3) e colocados em presença de luz, a 28°C, para germinação. Quando as raízes estiverem bem desenvolvidas e as estruturas foliares medirem cerca de 5 cm de comprimento (Figura 9 D), as plântulas

Tabela 3. Composição dos Meios de Cultivo Usados para a Cultura de Tecido de Sorgo.

Composição	Constituinte (mg/l)	Meio CIM (mg/l)	Meio SIM (mg/l)	Meio RM (mg/l)	Meio MS (mg/l)
Sais	¹ MS	4 300	4 300	4 300	4 300
Regulador de Crescimento	² 2,4 D	2,5	2,5	0	0
	³ ANA	0	0	0,25	0
Vitaminas	Myo Inositol	100	100	100	100
	Ácido Nicotínico	0	0	0,5	1,0
	Piridoxina HCl	0	0	0,5	10,0
	Tiamina HCl	1	1	0,1	1
Suplementos	Glicina	7,5	7,5	2	0
	DL- Asparagina	100	0	0	0
	Cinetina	0,2	0,2	0	0
	Sacarose	30 000	30 000	30 000	15 000
	Geneticina	2,5	2,5	0	0
	⁴ Phytigel	2 500	2 500	2 500	2 500

¹ Mistura basal de sais com macro e micronutrientes de acordo com Murashige and Skoog, (1962). Sigma M5524.

² Ácido 2,4 diclorofenoxiacético. Sigma D84072.

³ Ácido nattalenoacético. Sigma N0640.

⁴ Agente geleificante. Sigma

são transplantadas para vasos contendo uma mistura de solo e matéria orgânica. Na Embrapa Milho e Sorgo, utiliza-se uma mistura de 2/3 de solo e 1/3 de matéria orgânica (TDP 30/15), produzida pela Terra do Paraíso, (Holambra, São Paulo). Cada vaso deve ser coberto com uma sacola de plástica transparente e, em seguida, transferido para casa-de-vegetação (Figura 9 E). Os vasos devem ser irrigados abundantemente antes do transplante. Nos dias seguintes, para reduzir a umidade e aclimatar a plântula de sorgo, deve-se abrir gradativamente a sacola para que, ao final de uma semana, essa possa ser retirada. A irrigação deve ser feita individualmente, de acordo com a necessidade de cada vaso, tomando-se o cuidado de só voltar a irrigar quando realmente houver necessidade, de

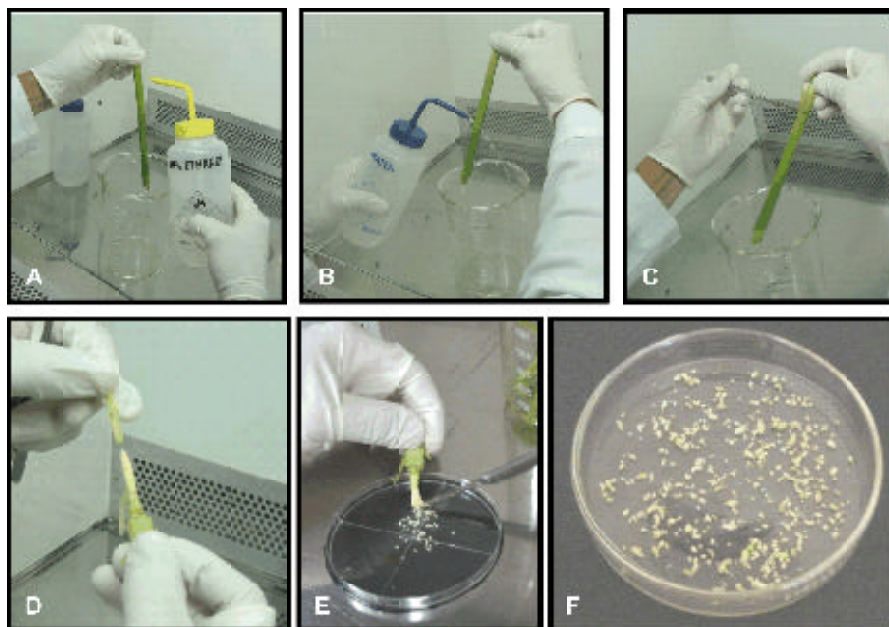


Figura 8. Indução de Calos Embrionários a Partir de Panícula Jovem de Sorgo em Meio de Cultivo. (A) Desinfestação da planta com etanol 70%; (B) Enxágüe da planta com água estéril; (C) Retirada da parte foliar com o auxílio de um bisturi; (D) Liberação da panícula; (E) Corte da panícula (~ 5mm) com auxílio do bisturi; (F) Fragmentos da panícula em meio de cultura.

modo a favorecer o crescimento das raízes e evitar a proliferação de fungos.

Transformação de Calos Embrionários de Sorgo Utilizando a Biobalística

DNA purificado é precipitado sobre as micropartículas pela adição de etanol e CaCl_2 . Por ser um processo que ocorre muito rapidamente, a precipitação do DNA sobre as micropartículas é uma das etapas mais críticas do bombardeamento, portanto, uma fonte de grande variação da eficiência de

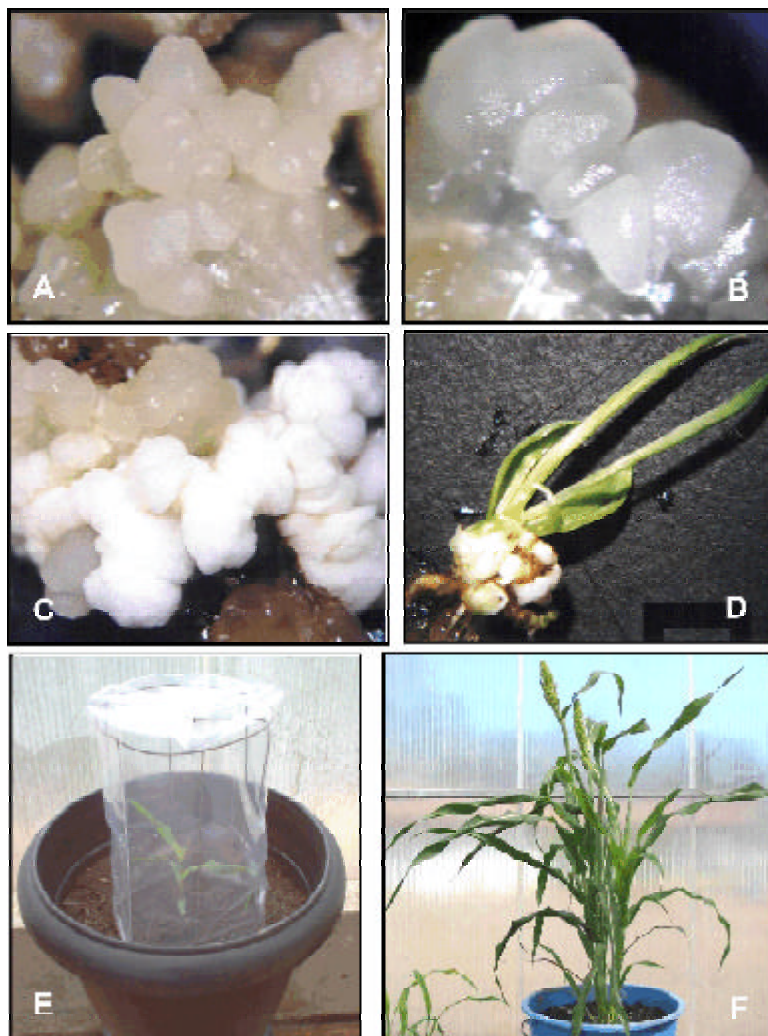


Figura 9. Calos Embriogênicos e Regeneração de Plantas de Sorgo em Cultura de Tecido. (A e B) Calos embriogênicos de sorgo após 3 semanas em meio de cultura CIM; (C) Calos embriogênicos maduros, regiões branco opacas; (D) Germinação de embriões; (E) Planta sendo aclimatada; (F) Planta em casa de vegetação.

transformação. O padrão de precipitação do DNA sobre as partículas é diferente a cada experimento, devido à dificuldade de manter o tungstênio em suspensão. Pequenas variações podem ocorrer entre os diferentes protocolos para precipitação do DNA nas micropartículas de tungstênio. O protocolo de preparação das micropartículas utilizado pela Embrapa Milho e Sorgo é descrito a seguir e foi desenvolvido para ser utilizado com o aparelho mostrado na Figura 1.

Precipitação do DNA sob as Micropartículas

1. Pesar, dentro de um microtubo, 60 mg de micropartículas de tungstênio M10 e acrescentar 1,0 mL de etanol 70%. Misturar vigorosamente e manter em agitador vortex durante 15 minutos.
 2. Centrifugar a 14.000 rpm durante cinco minutos.
 3. Remover e descartar o sobrenadante com o auxílio de uma micropipeta de 1000 μ L, tendo o cuidado de evitar o distúrbio do sedimento de micropartículas.
 4. Adicionar 1,0 mL de água Milli-Q estéril, misturar vigorosamente em agitador e centrifugar a 14.000 rpm, durante cinco minutos. Descartar o sobrenadante e repetir a operação de lavagem mais duas vezes.
 5. Após a última lavagem, descartar o sobrenadante e ressuspender as micropartículas em 1,0 mL de glicerol estéril 50% (v/v).
 6. Aliquotar, sob agitação constante, 50 μ L das partículas em microtubos Eppendorf. Armazenar a - 20°C e utilizar dentro de três a quatro semanas.
 7. Aproximadamente 24 horas antes do bombardeamento, colocar os explantes a serem bombardeados no centro (circunferência de 30 mm de diâmetro) de placas de 60 x 15 mm, contendo meio de cultura com alto potencial osmótico (12% sacarose).
- Antes de começar a precipitação, é recomendável colocar os suportes de metal das membranas para secar sobre papel toalha autoclavado.
 - Cada microtubo de precipitação é suficiente para seis tiros.

- Recomenda-se ligar o ar condicionado da sala de bombardeamento pelo menos duas horas antes do início da precipitação, para que a umidade relativa do ar seja reduzida.
8. Transferir uma alíquota de 50 μL da suspensão de micropartículas para um tubo de microcentrifuga. Antes de retirar a alíquota, homogeneizar bem o microtubo contendo as micropartículas. A partir desse ponto, durante todo o processo de precipitação do DNA sobre as micropartículas, usar sempre o vortex (agitação lenta). Todo o processo precisa ser conduzido sob condições assépticas.
 9. Adicionar 7 μL de DNA plasmidial purificado (estoque 1 μg / μL). Para purificar o DNA plasmidial, utiliza-se uma precipitação em gradiente de CsCl (Sambrook et al., 1998) ou pode-se utilizar algum kit de purificação, como, por exemplo, Kit Maxi Prep Qiagen (tip 500).
 10. Acrescentar simultaneamente 50 μL de CaCl_2 2,5 M e 20 μL de espermidina 0,1 M (Descartar sobras nos tubos de espermidina após o uso).
 11. Lavar o pellet com 150 μL de ethanol 70%, tendo o cuidado de não ressuspêndê-lo. Repetir a lavagem com etanol absoluto duas vezes.
 12. Incubar à temperatura ambiente, sob constante agitação, durante três minutos.
 13. Incubar à temperatura ambiente, sem agitação, por mais três minutos.
 14. Centrifugar durante 5 segundos a 5.000 rpm. Evitar uma centrifugação mais drástica, para não aglomerar excessivamente as micropartículas; isto prejudica a ressuspensão do pellet no final da precipitação. Remover o sobrenadante cuidadosamente.
 15. Acrescentar 60 μL de etanol absoluto. Homogeneizar vigorosamente até ressuspender o precipitado. Esta etapa não deve passar de 30 a 60 segundos, se a precipitação do DNA foi bem sucedida.
 16. Distribuir alíquotas de 7 μL na região central de cada membrana.

17. Bombardear os explantes de interesse dentro de duas horas, de acordo com as instruções do aparelho de biobalística disponível no seu laboratório.

Seleção de Plantas Transgênicas de Sorgo Após o Bombardeamento

1. Após o bombardeamento, os explantes são transferidos do meio CIM osmótico para o meio CIM+ CB, por sete dias, em câmara escura, a 27°C (Tabela 3).
2. Na segunda semana, os explantes são transferidos para meio de seleção SIM, suplementado com 6 mg/L de glufosinato de amônia (Herbicida Finale). O glufosinato de amônia é utilizado em nossas construções gênicas como o gene marcador de seleção. Os explantes são, então, mantidos nesse meio durante uma semana, em câmara escura, a 27°C.
3. Na terceira semana os explantes são transferidos para SIM suplementado com 9 mg/L de glufosinato de amônia e mantidos por uma semana em câmara escura à 27°C, na semana seguinte os explantes que sobreviverem são transferido para o mesmo meio e mantido nas mesma condições por mais 7 dias.
4. Entre a quinta e a sexta semana, os calos que sobreviveram ao processo de seleção são transferidos para o meio de maturação RM, suplementado com 6 mg/L de glufosinato de amônia e incubados por duas a três semanas em câmara escura, a 25°C.
5. Durante esse período, embriões somáticos, que normalmente apresentam aspecto brilhante e translúcido, passam a apresentar aspecto opaco e coloração branca-leitosa (Figura 9 B e C). O aparecimento dessas estruturas opacas é um indicativo de que os embriões estão prontos para germinação. Os calos maduros são, então, transferidos para Magentas (Sigma) contendo meio MS suplementado com 3 mg/L de glufosinato de amônia e mantidos sob luz (16 horas), a 27°C, para germinação.

6. Plantas medindo entre 3 e 5 cm de altura, com raiz bem desenvolvida, são transferidas para solo em casa de vegetação. Durante os três primeiros dias de aclimação, as plantas são mantidas sob uma cobertura plástica para manutenção da umidade. Nos dias seguintes, o plástico é gradativamente retirado.

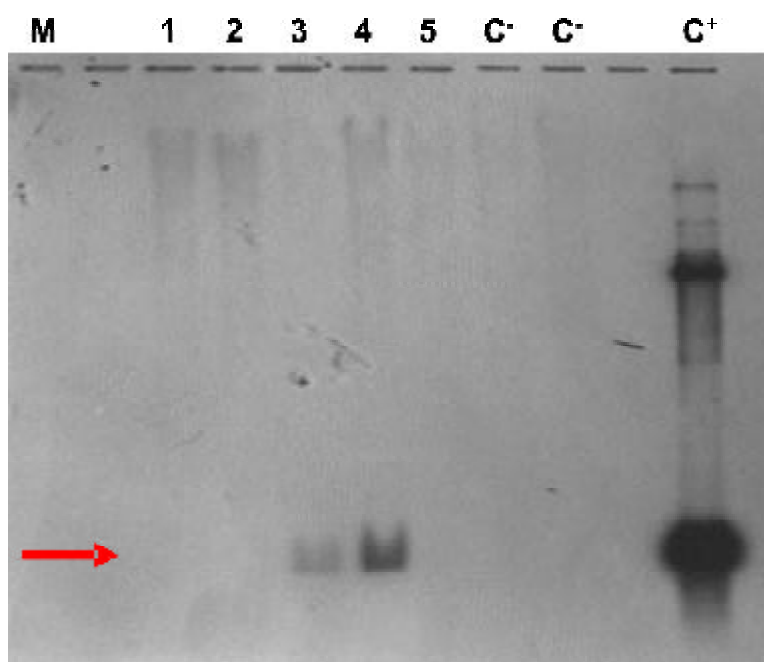


Figura 10. Southern Blot do DNA Genômico de Plantas de Sorgo Transgênicas. C⁻: Plantas de sorgo regeneradas em cultura de tecido, mas não transformadas (Controle Negativo); C⁺: Plasmídeo utilizado na transformação das plantas (Controle positivo); Canaletas sem DNA; Canaletas 1, 2 e 5: Plantas de sorgo regeneradas após o bombardeamento, mas que não foram transformadas (escapes); Canaletas 3 e 4: Plantas transgênicas de sorgo. Utilizou-se como sonda o promotor CaMV35S. Observe a ausência da sonda nas plantas controles e a presença de banda nas plantas transgênicas e no plasmídeo.

7. Para confirmar a transformação das plantas, análises de PCR e *Southern blot* são realizadas (Figura 10).

Identificação de Plantas Transgênicas

A confirmação da transgenia é feita através de análises de inserção do gene heterólogo no genoma e, também, pelo estudo da expressão da proteína heteróloga na planta gerada. A metodologia mais aceita atualmente para a confirmação da inserção do gene é a análise de *Southern blot*. Já a expressão do gene pode ser feita por *Northern blot* e a presença da proteína pode ser detectada pelo Western blot.

A técnica de *Southern blot* permite detectar fragmentos de DNA específicos em amostras de composições complexas, como DNAs genômicos. Em experimentos de transformação de plantas, essa técnica possibilita provar, de forma conclusiva, a integração de genes exógenos no genoma da mesma. A técnica de PCR pode ser utilizada para tal fim; no entanto, falsos positivos podem aparecer, devido a amplificações de quantidades mínimas de DNAs contaminantes contendo o gene analisado. Outra vantagem da técnica de Southern Blot é que, dependendo da enzima utilizada, pode-se identificar diferentes eventos de transformação, além de permitir a estimativa do número de cópias do transgene inserido no genoma da planta produzida. Esses tipos de informações não podem ser fornecidos pela análise da reação de PCR, devido à utilização de iniciadores (*Primers*) que amplificam somente as partes dos genes analisados (Romano, 1998).

A técnica de *Southern Blot* se baseia nas seguintes etapas:

a) Extração do DNA total da planta a ser analisada. Essa extração pode ser feita de qualquer tecido ou órgão da plantas. Recomenda-se que, durante o processo de extração do DNA, componentes que possam interferir na sua posterior clivagem com enzimas de restrição, tais como compostos fenólicos e carboidratos, sejam eliminados. Um dos processos mais usados

para a extração do DNA de plantas é o do CTAB, desenvolvido por Saghai-Marooif *et al.* (1984).

b) Após a extração do DNA total das plantas, o próximo passo é sua clivagem com enzimas de restrição. As enzimas de restrição são utilizadas para os estudos da integração do DNA heterólogo, bem como para uma análise do número de cópias do gene que estão presentes nas plantas transgênicas. As enzimas a serem utilizadas são, preferencialmente, aquelas de baixo custo e com reconhecimento de seis pares de bases. As mais comuns são a *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*. Os sítios de restrição ou os locais de reconhecimento e ação das enzimas podem estar dentro ou fora da construção gênica.

c) Os produtos da digestão são separados por tamanho, por eletroforese, em gel de agarose, utilizando uma voltagem baixa, 25-50 volts, para permitir uma melhor separação dos fragmentos. Dependendo do tamanho do gel e da voltagem utilizada, recomenda-se que a eletroforese seja feita durante toda a noite. No gel, deve ser incluída, como controle negativo, uma ou mais amostras de DNA, da mesma espécie da planta em estudo, não-transgênica. Essa amostra servirá para confirmar que a sonda utilizada reconhece somente o DNA heterólogo e nenhum DNA da planta não-transgênica. Após a separação dos fragmentos do DNA no gel de agarose, esse é corado com brometo de etídio, para verificar sua qualidade. O brometo de etídio é uma molécula que intercala nas hélices do DNA, tornando-o visível na presença de luz ultra-violeta. Por sua ação mutagênica, o brometo de etídio deve ser utilizado com bastante cautela.

d) O DNA fita dupla ainda no gel é desnaturado e transferido para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, utilizando a técnica de *Southern blot*. Geralmente, essa transferência é realizada durante aproximadamente 20 horas.

e) O DNA é fixado à membrana e, então, hibridado com uma sonda específica, para a detecção do DNA transgênico. A sonda utilizada deve ser marcada a quente (com isótopos radioativos) ou a frio (como é o caso de

digoxigenina, alcafos, etc.), para possibilitar sua detecção ao final do processo.

Em seguida, descrevemos os protocolos para a extração de DNA e *Southern blot* utilizados em nossos laboratórios.

Isolamento de DNA Genômico

Baseado no método de Saghai-Marooft et al. (1984), pags 81:8014-8018, com modificações.

1. Pesar 700 mg tecido liofilizado, ou 5 g de tecido verde. Moer com N₂ líquido.
2. Adicionar 10 mL tampão CTAB
3. Incubar a 65°C, por 90 minutos; a cada 15 minutos, homogeneizar.
4. Resfriar à temperatura ambiente, por cinco minutos, adicionar 5 mL de clorofórmio/octanol (24:1), misturar gentilmente por dez minutos.
5. Centrifugar a 3000 rpm, por 10 min.
6. Remover sobrenadante e adicionar novamente 5 mL de clorofórmio/octanol (24:1), misturar gentilmente por dez minutos.
7. Repetir o item 5.
8. Retirar a parte superior, para tubo de vidro.
9. Precipitar o DNA, adicionando 6 mL de isopropanol (-20° C).
10. Remover o precipitado com anzol de vidro, transferir para tubo de ensaio com 2mL de etanol 70%, por dois minutos.
11. Depois de secar o DNA ressuspender 400 µL TE pH 8.0 + 2 µL de RNase 10 mg/mL.
12. Incubar a 37° C, por uma hora.
13. Correr em gel de agarose 0,8%, para quantificação.
14. Pode-se, ainda, utilizar o espectrofotômetro (Abs 260 e 280 nm).

Soluções

❖ Tampão CTAB 2%:

Estoques	100mL
H ₂ O	46 mL
TRIS HCl 1M pH 7.5	20 mL
NaCl 5M	28 mL
EDTA 0.5M pH 8.0	4 mL
CTAB	2 g
β-Mercaptoetanol	2 mL

Obs.: Colocar o β-Mercaptoetanol usando uma capela de exaustão.

❖ TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA):

10 mL de Tris-HCl 1M , pH 8.0

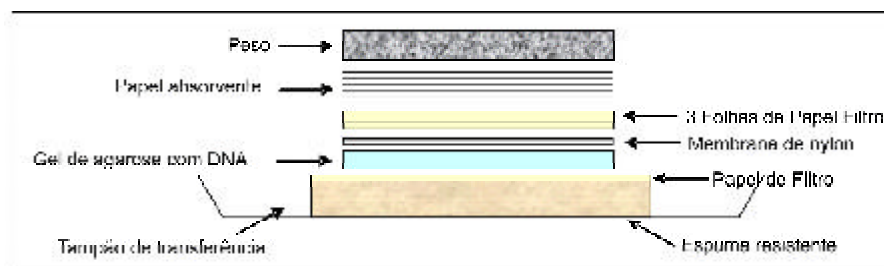
2 mL de EDTA 0,5 M, pH 8.0

q.s.p. 1000 mL

Southern Blot

(Transferência DNA do gel para membrana)

1. Depois de corar o gel com brometo de etídio e verificar sua qualidade, montar o "SOUTHERN BLOT" de acordo com a figura abaixo.
2. Deixar transferindo por 24 horas.
3. Visualizar a transferência do DNA, na membrana com lâmpada UV.
4. Lavar a membrana em SSC 2X por cinco minutos.
5. Imobilizar o DNA na membrana.
6. Hibridar ou armazenar a 4°C entre folhas de papel de filtro e dentro de saco de plástico.



Pré-Hibridação

1. Ligar o forno de hibridação e programar para 65° C.
2. Aquecer a garrafa de hibridação no forno a 65° C.
3. Descongelar o tampão de hibridação a 65° C.
4. Descongelar o DNA de esperma de salmão (st DNA – 10 µg/µL) a 65° C.
5. Desnaturar o st DNA a 100° C por dez minutos (banho-maria).
6. Vortexar o st DNA.
7. Pipetar 10 µL de st DNA por mL de solução de pré-hibridação (usar 150 µL de st DNA em um tubo Falcon com 15 mL de solução de pré-hibridação, a 65° C).
8. Fazer um rolo com a membrana e colocá-la dentro da garrafa com o DNA voltado para dentro.
9. Adicionar 15 mL da solução de pré-hibridação e fechar a garrafa (tampa azul para cima).
10. Rodar a garrafa para homogeneizar e cobrir a membrana com a solução.
11. Colocar a garrafa no forno de hibridação, a 65° C, e deixar por 5 horas.

Marcação da Sonda: Conforme as especificações do Kit *Ready-To-Go DNA Labeling Beads* (-dCTP) da Amersham Biosciences

Hibridação

Utilizar a mesma solução de pré-hibridação.

1. Desnaturar a sonda a 100° C, por dez minutos, em banho-maria (vedar o Eppendorf).
2. Pipetar a sonda na solução de pré-hibridação dentro da garrafa. (Colocar a garrafa no suporte plástico dentro da capela e pipetar a sonda de modo que ela não caia sobre a membrana).
3. Homogeneizar suavemente.
4. Colocar a garrafa no forno de hibridação, a 65° C, e deixar durante a noite. Verificar se a garrafa está rodando.

5. Descartar a solução de hibridação no descarte líquido (usar um pequeno pedaço de papel para limpar a boca da garrafa. Esse papel deve ser descartado no descarte sólido).

Lavagem da membrana

(todas as lavagens são feitas com um volume de 100 mL dentro do forno de hibridação)

- ◆ Aquecer as soluções a 65°C antes de utilizar.
- ◆ 1ª lavagem - SSC 1 X e SDS 0,1% (65°C) por 30 min.
- ◆ 2ª lavagem - SSC 1 X e SDS 0,1% (65°C) por 20 min.
- ◆ 3ª lavagem - SSC 0,5 X e SDS 0,1% (65°C) por 20 min.
- ◆ Descartar as soluções de lavagem no descarte líquido, limpando a boca da garrafa com um pequeno pedaço de papel
(*Não deixar a membrana secar durante os procedimentos de lavagem*).
- ◆ Após a última lavagem, escorrer o excesso de líquido das membranas.
- ◆ Checar as membranas com o contador Geiger
- ◆ Colocá-la entre filmes de plástico e colocadas em um cassete com tela intensificadora. A tela deve ficar entre a membrana e o filme. O filme deve ser aberto na sala escura e exposto à membrana por três dias (pode variar) a -80°C.
(*Não deixar a membrana secar em qualquer passo, porque o 32P se liga permanentemente a ela*)

Revelação do filme

- ◆ Solução reveladora – 2 min
- ◆ Lavar o filme com água – 30 seg
- ◆ Solução fixadora – 2 min
- ◆ Lavar novamente com água e secar o filme.
- ◆ Estoque a membrana a -20°C. Deve-se tirar a radiação das membranas o mais rápido possível, para evitar a permanente ligação do 32P

Solução para a Transferência do DNA para a Membrana

Tampão de Transferência (0,4M de NaOH):

Estoques	1000 mL
Hidróxido de sódio	16,00 g

Soluções para Lavagem da Membrana

Estoques	100 mL
SSC 1 X	5 mL SSC 20 X
SDS 0,1%	500 µL SDS 20%
SSC 0,5 X	2,5 mL SSC 20 X

Solução de Hibridação

Estoques	250mL
NaCl	10,90 g
Ácido cítrico (trisódio dihidratado)	9,19 g
SDS 20%	7,5 mL
Na ₃ PO ₄ * (pH 7,5)	12,5 mL
Denhard's** 50 x	25 mL
EDTA 0,25 M pH 8,0	2,5 mL
Dextran Sulfato 50%	25 mL

- * 1,0 M NaPO₄ = 1M Na₂PO₄ = 1M NaH₂PO₄ na razão de ~ 5:4
- ** Denhard's solução (50 x)

Dissolver 1g de Ficoll, 1g de polyvinyl pirrolidona e 1g de BSA (pentax Fração V, Fisher) em 100 mL H₂O. Esterilizar por filtração (0,25 µm) em frascos autoclavados. Trocar o filtro a cada 100 mL. Aliquotar e estocar a – 20° C.

Referências Bibliográficas

BARCELO, P.; HAGEL, C.; BECKER, D.; MARTIN, A.; LORZ, H. Transgênic cereal (tritordeum) plants obtained at high efficiency by microprojectile bombardment of inflorescence tissue. . **Plant Journal** : for cell and molecular biology, Oxford, v. 5, p. 583-592, 1994.

BECKER, D.; BRETTSCHEIDER, R.; LORZ, H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. **Plant Journal** : for cell and molecular biology, Oxford, v.5, p.299-307, 1994.

BRASILEIRO, A. C. M.; CANÇADO, G. M. A. Plantas transgênicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v. 21, n. 204, p.28-35, 2000.

BRETTSCHEIDER, R.; BECKER, D.; LÖRZ, H. Efficient transformation of scutellar tissue of immature embryos. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 94, p. 737-748, 1997.

CASAS, A.M.; KONONOWICZ, A. K.; ZEHR, U. B.; TOMES, D. T.; AXTELL, J. D.; BUTTLER, L. G.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 90, p. 11212-11216, 1993.

COELHO, A. M.; WAQUIL, J. M.; KARAN, D.; CASELA, C. R.; RIBAS, P. M. 2002. Seja o doutor do seu sorgo. **Informacoes Agronomicas**, Piracicaba, n.100, dez. 2002. Arquivo do Agrônomo, Piracicaba, n.14, 24p. dez. 2002. Encarte.

DEVI, P.; STICKLEN, M. Culturing shoot-tip clumps of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] and optimal microprojectile bombardment parameters for transiente expression. **Euphytica**, Wageningen, v. 125, p. 45-50, 2002.

POTRYKUS, I. Gene transfer to plants: assessment and perspectives. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 79, p. 125-134, 1990.

RODRIGUES, P. H. M.; SENATORE, A. L.; LUCCI, C. S.; ANDRADE, S. J. T.; LIMA, F. R.; MELOTTI, L. Valor nutritivo da silagem de sorgo tratada com inoculantes enzimo-microbianos. **Acta Scientiarum**, Londrina, v. 24, p.1141-1145, 2002.

ROMANO, E. Análise da integração do DNA pela técnica de *Southern Blot*. In: BRASILEIRO, A. C. M.; CARNEIRO, V. T. C. (Ed.). **Manual de transformação genética de plantas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, 1998. Cap 14, p. 205-222.

SAGHAI-MAROOF, M. A.; SOLIMAN, K. M.; JORGENSEN, R. A.; ALLARD, R. W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, p. 8014 – 8019, 1984.

SANFORD, J. C.; SMITH, F. D.; RUSSELL, J. A. Optimizing the biolistic process for different biological applications. In: WU, R. (Ed.). **Recombinant DNA – Part H**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 483-510 (Methods in Enzymology, 217).

TADESSE, Y.; SÁGI, L.; SWENNEN, R.; JACOBS, M. Optimisation of transformation conditions and production of transgenic sorghum (*Sorghum bicolor*) via microparticle bombardment. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Hague, v. 75, p. 1-18, 2003.

ZUPAN JR, ZAMBRYSKI, P. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v.16, p. 279–295, 1997.